

骨组织工程中成骨、破骨细胞三维空间培养的研究进展

钱超¹ 综述 郭杨¹, 马勇^{1,2} 审校

摘要 骨组织工程中成骨、破骨细胞的空间分布对其治疗效果有决定性的影响。不同的细胞外基质因其不同的孔隙结构和表面微形貌,细胞在其中的空间分布情况各异。同时,在中医药、物理、西药以及生长因子等因素的干预下,细胞在三维空间结构中的分布也会受到影响。研究成骨、破骨细胞在三维结构中的空间分布变化,可以推进骨组织工程研究的进展。

关键词 骨组织工程; 三维空间; 细胞分布; 中医药

中图分类号 R 274.9; R 683

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0280-03

随着组织工程学的发展,骨组织的体外培养和再移植正在渐渐取代传统的骨缺损治疗模式,并可应用于治疗骨质疏松等多种疾病。骨组织工程中细胞的空间分布对疾病的治疗效果有决定性影响,因此细胞的三维空间培养逐渐成为了研究热点,为研究人员提供了新的思路。所谓细胞的三维空间培养,是将体外培养的高浓度功能相关的活细胞种植在一种生物相容性好可降解的天然或人工合成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,该材料能更好地模拟人体内环境,使细胞按预制的形态生长和分布。现将近几年来对三维空间内成骨、破骨细胞的培养研究整理归纳并加以论述探讨。

1 ECM 对细胞分布的影响

1.1 ECM 的种类 目前在骨组织工程研究中选用的 ECM 主要有:天然有机高分子材料、天然无机材料、人工合成有机材料、人工合成无机材料以及复合类材料。

不同的 ECM 因为其超微结构的差别,有其独特

的优点和不足,种植在其中的细胞也会呈现不同的空间分布情况。凝胶为一种具有网状结构的半固态天然有机材料,其支架平均孔径为 75 ~ 400 μm ,网状结构中的结合水可以流动,使凝胶中的细胞能和外界进行物质交换^[1],由于凝胶网络的承载作用,细胞在凝胶中的形态为圆形,有利于细胞的联系、信息传递和代谢物质的交换;但凝胶常常存在机械性较差等缺点。陶瓷化骨等天然无机材料具有天然的骨结构,如果处理手段足够完善,其超微结构保存完整,细胞种植其中可以出现体内相似的空间分布,但也有抗压较低、易碎等缺点^[2]。以多孔钛为代表的人工合成无机材料目前应用较为广泛,但存在与骨组织相差较大等缺点。复合类材料是通过一定的方法整合两种或多种材料而形成,具有“取长补短”的优势,朱振宗等^[3]通过实验研究发现细胞在海藻酸钠复合载体中生长分布良好,形成球状细胞团,这样独特的三维结构更有利于细胞生长。因此,在体外三维培养细胞时越来越多的人选择采用复合型载体。

1.2 孔隙结构对细胞分布的影响 评价支架材料的重要参数之一是支架材料的孔隙结构。研究^[4]表明,充足的血液供应是形成良好骨组织的基础,孔隙率与孔径大小对其有决定性的影响。Liu et al^[5]研究发现,随着培养时间延长和孔隙率的增加,各组成骨细胞在支架材料上的空间分布均呈增长的趋势。Yeo et al^[6]提出组织工程支架的孔径尺寸应在 200 ~ 400 μm 范围内有利于新生骨组织在孔隙内部矿化沉积。朱建华等^[7]通过研究 PAN/CS/BCP/PLGA 复合支架发现:大孔小孔相连通的孔隙结构具有 85.7% 的高孔隙率,类似于天然松质骨的内连孔隙结构,平均孔径在 400 ~ 500 μm 之间,大孔发挥骨引导性,小孔则增加支架的内部连通性,有利于成骨、破骨的空间分布生长。

1.3 表面微形貌对细胞分布的影响 在支架及其表面应用纳米技术可使其表面能和活性增大,增加细胞在支架上的黏附、迁移以及增殖分化,从而改变细胞三维培养的空间分布。李明等^[8]认为纳米表面对成骨细胞有选择性吸附作用,可增强成骨细胞

2013-08-29 接收

基金项目:江苏省自然科学基金(编号: BK2011812);江苏省“六大人才高峰”资助项目(编号: 2010-WS-082)

作者单位:¹ 南京中医药大学第一临床医学院,南京 210046

² 南京中医药大学附属医院江苏省中医院骨伤科,南京 210029

作者简介:钱超,男,硕士研究生;

马勇,男,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zhongyi-my@263.net

的黏附,减少成纤维细胞的黏附;田园等^[9]提出细胞的粗糙度和湿润度以及表面离子都会影响成骨细胞的黏附和铺展。Liu et al^[10]通过静电层层自组方法对纤维支架进行表面修饰,发现提高了支架亲水性(接触角降低),并且提高了细胞黏附和增殖的能力,从而证明了支架表面静电层对三维空间培养的细胞空间分布的影响。

1.4 ECM 的制备方法对细胞分布的影响 不同的ECM的制备方法必然会对生长于其中的种子细胞的分布情况造成影响。李娜娜等^[11]以魔芋葡甘聚糖、Ⅱ型胶原和壳聚糖为主要原料,通过共混的方法,经静置减压脱泡、倒模、干燥、碱处理制备魔芋葡甘聚糖/Ⅱ型胶原/壳聚糖复合材料,并证实了种子细胞在其中良好的黏附与增殖。张冬明等^[12]采用多次复合交联法制备了三元聚磷酸钙基复合支架材料,并研究发现降解前该支架材料结晶良好且含有良好孔隙结构,降解后三元支架的有机相出现三维网状架构。

2 成骨、破骨细胞三维空间培养的干预

2.1 中医药 杜晓岩等^[13]在羟基磷灰石-磷酸三钙/壳聚糖复合支架中加入骨碎补颗粒,发现成骨细胞在含有骨碎补的实验组中生长密度较大,证明了中药骨碎补对成骨细胞三维培养的黏附和爬行具有促进作用,从而改变成骨细胞的空间分布。吴涛等^[14]在组织工程支架中加入淫羊藿提取物淫羊藿苷,发现三维空间培养的成骨细胞的黏附及密度明显增高,细胞聚集生长。王园园^[15]研究了纳米羟基磷灰石及其与载药壳聚糖复合材料,发现载淫羊藿膜使支架表面粗糙而利于骨髓基质干细胞(BMSCs)的黏附,而其吸水率和力学性能均有所降低。陈虹等^[16]制备了CPC与杜仲叶水溶性提取物的复合载体,发现成骨细胞与材料黏附紧密,密集处复层生长。许春姣、邹琴等^[17-18]都研究黄芪及其有效成分加入ECM,前者发现其表面微孔增加,后者发现其细胞吸附率增高,同时细胞生长更密集。两者的发现都证实细胞在其中的空间分布发生了变化。

2.2 物理因素 不同的物理因素刺激对细胞的形态、基因表达、代谢、生长因子分泌等均会造成影响,导致细胞在三维空间培养的分布发生改变,近年来引起许多学者的注意。

2.2.1 力学刺激 徐晓莹^[19]采用自行研制的压载设备对成骨细胞及其生长的脱钙松质骨支架复合物

进行力学刺激,发现其能改变三维空间中的细胞形态,促进成骨细胞的空间黏附,并趋于向骨细胞转化。王林等^[20]用发新型旋转式生物反应器使兔颅骨成骨细胞接种支架后旋转培养,发现旋转培养组细胞支架内的空间分布的均匀性优于静态培养组;Tang et al^[21]取成骨细胞悬液复合培养于生物衍生骨支架中加载表观应变 $1\ 000\ \mu\epsilon$ 、 $3\ \text{Hz}$ 、 $3\ \text{min/d}$ 的正弦载荷,检测成骨细胞增殖快,使空间分布的细胞密度增加。

2.2.2 超声 Torres-Sanchez et al^[22]研究发现,超声可以改变聚氨酯凝胶的孔隙率,从而改变其内细胞的空间分布,同时其研究还证实孔隙率的变化与超声声压与频率呈正比。

2.2.3 高压氧 Zheng et al^[23]研究表明高压氧增加了骨结节的形成、钙沉积,显著增强碱性磷酸酶的活力,从而促进成骨细胞的增殖和分化,进而改变体外培养的成骨细胞空间分布情况。

2.3 西药 刘璐^[24]在三维空间内研究了力学荷载和 α -玉米赤酶醇(α -ZAL)联合对小鼠成骨、破骨细胞的影响,发现高浓度 α -ZAL能够抑制成骨细胞增殖,促进成骨细胞分化,并抑制破骨细胞的活性,从而影响三维空间中成骨细胞和破骨细胞的分布情况,有助于三维空间的骨形成。李捷等^[25]通过对糖皮质激素作用下大鼠股骨远端松质骨超微结构的观察:发现随着给药时间的增加,骨小梁的立体网状结构破坏范围加大,这一结论证实糖皮质激素可以对体内的成骨细胞与破骨细胞的空间分布产生影响。

2.4 细胞因子 许少刚等^[26]将成骨细胞种植于生物活性玻璃与转化生长因子构建的三维立体生物支架中培养,证实了生长因子可促进成骨细胞依托生物支架材料在生物体内增殖和分化。陈思等^[27]模拟失重状态诱导成骨细胞产生类似骨质疏松时的失能状态,并实验证实胰岛素样生长因子-1能增加成骨细胞整合素亚单位表达,使成骨细胞数目增多,并促进其分化。Weinreb et al^[28]研究发现前列腺素 E_2 能使成骨细胞形态发生变化。在这些研究中成骨细胞的空间分布情况都发生了变化。

3 讨论

决定骨组织工程成功的条件之一是成骨、破骨细胞在ECM中的三维空间分布情况。目前对骨组织工程中成骨、破骨细胞空间分布的研究发现,不同

的 ECM、ECM 表面微形貌、ECM 的制备方法以及中医药、物理、西药以及细胞因子等因素干预均可影响 ECM 的孔隙结构或细胞的黏附、增殖、分化,进而改变成骨、破骨细胞在其中的空间分布情况,但具体发生的机制还有待进一步研究。

ECM 的孔隙结构直接影响成骨/破骨细胞在其中的空间分布。ECM 孔隙率的要求一般是越高越好,但最合适的孔径大小目前尚未统一。高孔隙率以及合适孔径的复合型材料的 ECM 将在未来的基础研究和临床应用中具有广阔的前景。骨组织工程已广泛应用于骨质疏松、骨坏死等骨伤疾病的治疗,并取得了满意的疗效。骨组织工程的前景依赖对种子细胞和 ECM 研究。所以对于不同疾病的骨组织工程最佳成骨、破骨细胞空间分布情况的研究必将成为未来骨组织工程研究的方向。

参考文献

- [1] Zhang L, Tang P, Zhang W, et al. Effect of chitosan as a dispersant on collagen-hydroxyapatite composite matrices [J]. Tissue Engineering, 2010, 16: 71-9.
- [2] 谭勇海, 姜苗苗, 韩海霞, 等. 陶瓷化骨对成人骨髓基质干细胞分化的影响 [J]. 中医正骨, 2012, 24(5): 23-6.
- [3] 朱振宗, 梁伟国, 沈雁, 等. 海藻酸钠复合载体长期培养软骨细胞的生物学稳定性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(16): 2867-70.
- [4] Annabi N, Nichol J W, Zhong X, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2010, 16(4): 371-83.
- [5] Liu L, Li R, Zhang L, et al. Mechanical properties of hyaluronic acid modifying chitosan/collagen/nano-hydroxyapatite composite scaffold and its effect on osteoblast proliferation [J]. JCRTER, 2011, 15(38): 248-51.
- [6] Yeo M, Lee H, Kim G. Three-dimensional hierarchical composite scaffolds consisting of polycaprolactone, beta-tricalcium phosphate, and collagen nanofibers: fabrication, physical properties, and *in vitro* cell activity for bone tissue regeneration [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(2): 502-10.
- [7] 朱建华, 马珊珊, 王晶彦, 等. 多孔 PAN/CS/BCP/PLGA 复合支架的制备与分析表征 [J]. 中国体视学与图像分析, 2011, 16(3): 283-8.
- [8] 李明, 杨婉洵, 夏海斌. 骨内种植体表面纳米改性对其生物学活性的影响 [J]. 口腔医学研究, 2011, 27(5): 447-8.
- [9] 田园, 王国平, 夏露. 种植体表面微形貌对成骨细胞反应的影响 [J]. 口腔医学, 2012, 32(4): 247-9.
- [10] Liu X, Smith L, Ma P. Surface engineering of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds via self-assembly technique for bone tissue engineering [J]. J Biomed Nanotechnol, 2005, 1(1): 54-60.
- [11] 李娜娜, 潘兴华, 段开文, 等. 魔芋葡甘聚糖/II型胶原/壳聚糖复合材料的制备及性能 [J]. 材料科学与工程学报, 2009, 27(6): 870-5.
- [12] 张冬明, 王践云, 詹陶, 等. 骨组织工程用聚磷酸钙基复合支架材料制备及性能初步探索 [J]. 生物医学工程杂志, 2010, 27(5): 1047-50.
- [13] 杜晓岩, 毛艳, 李慕勤, 等. 羟基磷灰石-磷酸三钙/壳聚糖骨碎补复合材料修复骨缺损的实验研究 [J]. 中国美容医学, 2009, 18(8): 1125-7.
- [14] 吴涛, 南开辉, 陈景帝, 等. 可控释淫羊藿苷的仿生组装骨诱导修复材料 [J]. 科学通报, 2009(9): 1198-206.
- [15] 王园园. 纳米羟基磷灰石及其与载药壳聚糖复合材料研究 [J]. 四川大学, 2007.
- [16] 陈虹, 李万红, 林军. CPC/杜仲叶复合载体的制备及其性能测定 [J]. 口腔材料器械杂志, 2008, 17(4): 184-8, 95.
- [17] 许春姣, 翦新春, 彭解英, 等. 黄芪壳聚糖/聚乳酸多孔支架对犬骨髓基质细胞生物学行为的影响 [J]. 中南大学学报(医学版), 2005(3): 283-7.
- [18] 邹琴, 张利, 左奕, 等. 载黄芪多糖骨水泥的理化性能及体外细胞相容性研究 [J]. 功能材料, 2008, (9): 1515-8.
- [19] 徐晓莹. 骨组织工程中细胞三维培养力学环境的研究 [J]. 军事医学科学院卫生装备研究所, 2009.
- [20] 王林, 王臻, 李祥, 等. 旋转式动态三维培养结合可控管道结构支架体外节段性骨的构建 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(3): 200-3.
- [21] Tang L L, Wang Y L, Pan J, et al. The effect of step-wise increased stretching on rat calvarial osteoblast collagen production [J]. J Biomech, 2008, 37(1): 157-61.
- [22] Torres-Sanchez C, Corney J R. Effects of ultrasound on polymeric foam porosity [J]. Ultrason Sonochem, 2008, 15(4): 408-15.
- [23] Zheng Q, Hung G, Yang J, et al. Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways? [J]. Biol Chem, 2007, 388(7): 755-63.
- [24] 刘璐. 组织工程化培养模型下力学载荷与植物雌激素联合调控小鼠前成骨细胞及骨重建机制的研究 [J]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [25] 李捷, 刘玲萍, 陈宏, 等. 糖皮质激素作用下大鼠股骨远端松质骨超微结构改变: 扫描电镜观察结果 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(9): 1521-4.
- [26] 许少刚, 赵健宁. 成骨细胞在生物活性玻璃与 TGF- β 复合生物支架上培养的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2007, 20(5): 295-8.
- [27] 陈思, 黄懿文, 杨锐, 等. 胰岛素样生长因子-1 对模拟失重下成骨细胞整合素亚单位表达的影响 [J]. 广东医学, 2013, 34(4): 528-31.
- [28] Weinreb M, Suponitzky I, Keila S. Systemic administration of anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow [J]. Bone, 2008, 20(6): 521-6.